

⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑩ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3029307 A1

⑥ Int. Cl. 3:
A 61 K 31/715
A 61 K 31/40

⑫ Aktenzeichen: P 30 29 307.3
⑬ Anmeldetag: 1. 8. 80
⑭ Offenlegungstag: 4. 3. 82

Deinrädeigentum

⑮ Anmelder:
Dr. Eduard Fresenius, Chemisch-pharmazeutische Industrie
KG, 6380 Bad Homburg, DE

⑯ Erfinder:
Pitz, Heiner, Dipl.-Chem. Dr., 6382 Friedrichsdorf, DE;
Sommermeyer, Klaus, Dipl.-Chem. Dr., 6365 Rosbach, DE

DE 3029307 A1

⑮ Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel

DE 3029307 A1

KUHNEN & WACKER

PATENTANWALTSBÜRO

3029307

REGISTERED REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

Dr. E. Fresenius
Chem. pharm. Industrie KG

6380 Bad Homburg

PATENTANWÄLTE
R.-A. KUHNEN*, DIPL.-ING.
W. LUDERSCHMIDT**, DR. DIPL.-CHEM.
P.-A. WACKER*, DIPL.-ING., DIPL.-WIRTSCH.-ING.

11 FR 0331 4/gc

Patentansprüche

1. Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel der allgemeinen Formel I



bei dem zellfreies Hämoglobin Hb kovalent über reaktive Gruppen R_1 und R_2 und einen Brückenliganden B mit einem Polysaccharid M verbunden ist, dadurch gekennzeichnet,

daß B eine ggf. ein- oder mehrfach ungesättigte aliphatische Gruppe mit 3-14 C-Atomen, eine Cykloalkylgruppe mit bis zu 14 C-Atomen oder eine Arylgruppe mit bis zu 14 C-Atomen bedeutet und die Gruppen R_1 und R_2 gleich oder verschiedenen Gruppierungen der Formel $-O-, -NH-, -N-, -S-, -S(CH_2)-$, $=N-(CH_2)_m-NH-, -NH-(CH_2)_m-NH-, -N-(CH_2)_m-N-$, eine Carboxy- oder eine Hydrazidgruppe bedeutet, wobei $m = 0$ oder eine ganze Zahl von 1-14 bedeutet.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Alkylgruppe mit 4-10 C-Atomen bedeutet.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Alkylgruppe von 4-8 C-Atomen bedeutet.

BÜRO 6370 OBERURSEL**
LINDENSTRASSE 10
TEL. 06171/56849
TELEX 4186343 real d

BÜRO 8050 FREISING-
SCHNEGGSTRASSE 3-5
TEL. 08161/62091
TELEX 526547 pawa d

ZWEIGBÜRO 8390 PASSAU
LUDWIGSTRASSE 2
TEL. 0851/36616

TELEGRAMMADRESSE PAWAMIC POSTSCHICK MÜNCHEN 1360 82-802

ORIGINAL INSPECTED

000004000

3029307

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Butylgruppe bedeutet.
5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Pentylgruppe bedeutet.
6. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B eine Hexylgruppe bedeutet.
7. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß B ein von trimerisiertem Glutardialdehydstammender Rest ist und R₁ eine Gruppe der Formel $-N-(CH_2)_m-N-$ oder $-NH-(CH_2)_m-NH-$ ist, wobei m die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung besitzt.
8. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß m den Wert = 0 hat.
9. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß R₂ die gleiche Bedeutung wie R₁ besitzt, wobei m = 0 ist.
10. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R₁ und R₂ jeweils eine Gruppe -O- sind und B eine Phenylgruppe darstellt, die in 1- und 4-Stellung mit den Resten R₁ und R₂ verbunden ist.
11. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid M Dextran mit einem Molekulargewicht von M_w = 10.000 bis 500.000 ist.
12. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid M Hydroxyäthylstärke mit einem Molekulargewicht von M_w = 10.000 bis 500.000 ist.
13. Verfahren zur Herstellung des Blutersatzmittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - a) entweder die Hydroxygruppe eines Polysaccharids

3029307

aktiviert und das erhaltene aktivierte Produkt mit einer funktionellen Endgruppe einer Brücke B verknüpft, oder das Polysaccharid M mit einer stark reaktiven Endgruppe der Brücke B verknüpft und b) das erhaltene Produkt über die andere endständige reaktive Gruppe der Brücke B mit zellfreiem Hämoglobin verbindet.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid durch Perjodat zu einer Aldehydgruppen enthaltenden Verbindung aktiviert wird, die mit einer oder mehreren endständigen Aminogruppen der Brücke B oder mit Hydrazin umgesetzt wird, wobei das mit Hydrazin erhaltene Produkt mit einer endständigen Aldehydgruppe der Brücke B umgesetzt wird.
15. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Polysaccharid M mit p-Benzochinon bei einem pH-Wert von 6-8 und anschließend das erhaltene Produkt mit Hämoglobin umgesetzt werden.

KUHNEN & WACKER

PATENTANWALTSBÜRO

3029307

REGISTERED REPRESENTATIVES BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

PATENTANWÄLTE

Dr. E. Fresenius
Chem. pharm. Industrie KG

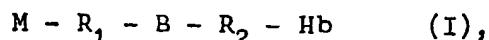
R.-A. KUHNEN*, DIPL.-ING.
W. LUDERSCHMIDT**, DR., DIPL.-CHEM.
P.-A. WACKER*, DIPL.-ING., DIPL.-WIRTSCH.-ING.

6380 Bad Homburg

11 FR 0331 4/gc

Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel

Die Erfindung betrifft ein Hämoglobin enthaltendes Blutersatzmittel der allgemeinen Formel I,



bei dem zellfreies Hämoglobin Hbkovalent über reaktive Gruppen R_1 und R_2 und einen Brückenliganden B mit einem Polysaccharid M verbunden ist, für den Sauerstofftransport sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung.

Üblicherweise können Blut- und Plasmaverluste bis zu etwa 1,5 l durch Infusion kolloidalen Volumenersatzmittel ausgeglichen werden. Zu derartigen Volumenersatzstoffen gehören beispielsweise Dextrane, Hydroxyäthylstärke und Gelatine. Wenn jedoch dieses Volumen von ca. 1,5 l überschritten und nicht sofort ersetzt wird, entsteht beim menschlichen oder tierischen Organismus der hämorragische Schock, da derartige Blutverluste nicht ohne Gefahr durch erythrozytenfreie Lösungen aufgefüllt werden dürfen. In einem solchen Fall kann nur Vollblut übertragen werden, dem die bekannten Risiken anhaften. Zu derartigen Risiken gehören eine beschränkte Lagerfähigkeit, die Gruppenspezifität (Rhesusfaktoren u. dgl.), Immunisierungsprobleme, die durch körperfremde Substanzen entstehen, mit Krankheitsträgern (bei-

BURO 6370 OBERURSEI **
LINDENSTRASSE 10
TEL. 06171 56849
TELEX 4180343 real d

BURO 8-50 FREISING*
SCHNEEGSTRASSE 3-5
TEL. 081 51/62091
TELEX 526547 pawa d

ZWEIGBURO 8390 PASSAU
LUDWIGSTRASSE 2
TEL. 0851/36616

TELEGRAMMADRESSE PAIVAMUC - POSTSCHECK MÜNCHEN 1360 52-802

ORIGINAL INSPECTED

-/-

1 spielsweise Hepatitisviren) infizierte Vollblutkonserven,
Aggregatbildung von Blutplättchen und Blutkörperchen u. dgl.
Diese und weitere Risikenfaktoren sind beispielsweise in der
Monographie von U.F. Gruber "Blutersatz", Springerverlag,
5 1968, beschrieben.

Zur Lösung des Problems wurden u.a. Emulsionen von fluor-
ierten Kohlenwasserstoffen und der zellfreie Einsatz von
Hämoglobinlösungen vorgeschlagen. Diese Versuche scheiter-
ten jedoch, da einerseits bei den fluorierten Kohlenwasser-
stoffen keine ausreichende Emulsionsstabilität und quanti-
tative Ausscheidung gegeben sind, andererseits auch nach
der vollständigen Beseitigung von Zellfragmenten, die zu
nierentoxischen Effekten führten, das stromafreie, gelöste
10 Hämoglobin weder die erforderliche Sauerstoffaufnahme- oder
-abgabekapazität aufweist noch ausreichend lange im Körper
verbleibt, da es bereits nach relativ kurzer Zeit durch die
Niere ausgeschieden wird. Um die Halbwertszeit der Ausschei-
dung zu erhöhen, wurden deshalb gem. DE-OS 26 46 854 Sub-
15 stanzen zur Verwendung als Blutersatz oder Blutstrekker er-
zeugt, bei denen Hämoglobin über eine kovalente Bindung an
ein makromolekulares Produkt gebunden ist. Während als Ma-
kromoleküle Dextran oder Hydroxyäthylstärke, die jeweils ein
Molekulargewicht von 5000 bis 2000000 besitzen, in Frage
20 kommen können, wird die kovalente Bindung dadurch herge-
stellt, daß Hydroxygruppen der Polysaccharide aktiviert und
diese aktivierte funktionellen Gruppen, ggf. über einen
Brückenliganden, mit dem Hämoglobin gekuppelt werden. Akti-
vierte Zwischenprodukte der Makromoleküle lassen sich durch
25 Reaktionen mit Bromcyan, einem ω -Halogenalkylamin oder Per-
jodat herstellen. Anschließend erfolgt entweder eine direkte
Kupplung mit Hämoglobin oder eine Ankupplung über einen
kurzkettigen Spacer. Obwohl durch die Ankupplung die Aus-
scheidungen von Hämoglobin durch die Niere ver-
30 langsam werden, wodurch die Wirkungsdauer des Hämoglobin
erheblich erhöht wird, ist andererseits die Sauerstoffbin-
dungs- und -abgabeeigenschaft des Endprodukts gem. DE-OS
35 26 46 854 nicht ausreichend, da bei weitem nicht die sigmoide

1 Sauerstoffaufnahme -/abgabekurve des reinen Hämoglobins erreicht wird. Diese sigmoide Funktion ist jedoch eine wichtige Voraussetzung für die Sauerstoffaufnahme in der Lunge und Sauerstoffabgabe in den peripheren Muskelgeweben. Sofern 5 diese Eigenschaft nicht in einem genügenden Maß erreicht wird, besteht weiterhin die Gefahr eines hämorragischen Schocks.

10 Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Blutersatzmittel auf der Basis eines an eine makromolekulare Verbindung gekoppelten Hämoglobins zu schaffen, das einerseits eine hohe Verweildauer im Körper aufweist, andererseits der Sauerstoffaufnahme- oder Abgabeeigenschaft des natürlichen Hämoglobins weitgehend angenähert ist.

15 Diese Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 gelöst.

20 Das erfindungsgemäße Blutersatzmittel läßt sich bei Mensch und Tier gleichermaßen einsetzen, wobei die vorstehend genannten Nachteile, die durch Übertragung von konserviertem Blut entstehen, nicht auftreten. Weiterhin läßt sich dieses Mittel über lange Zeit lagern und kann im Bedarfsfall durch einfaches Mischen mit Wasser und Auflösen darin sofort eingesetzt werden.

25 Dabei hat sich herausgestellt, daß die Volumenverweilzeit in Abhängigkeit von der Kettenlänge und der Modifizierung des Brückengliedes variierbar ist und bis zu 10h betragen kann, d.h., daß nach 10 Stunden noch 50% des infundierten 30 Volumens im Kreislauf nachzuweisen sind. Außerdem sind die erfindungsgemäßen Produkte biologisch akzeptabel und erzeugen u.a. keine allergischen Reaktionen.

35 Die erfindungsgemäßen Produkte bestehen im wesentlichen aus Polysaccharid als makromolekulare Verbindungen, die als Matrix M bezeichnet werden, einer chemischen Brücke B ("Spacer") und einem Liganden Hb, wobei die Brücke B jeweils über reaktive Gruppen R_1 und R_2 mit der Matrix M bzw. dem Liganden Hb,

1 der das Hämoglobin darstellt, verbunden ist.

5 Als Matrix kommen makromolekulare Polyhydroxy-Verbindungen, wie Polysaccharide, in Frage, wobei Dextrane und Hydroxy-
athystärke mit einem Molekulargewicht von 5000 bis 1000000
10 bevorzugt sind. Besonders bevorzugt sind* Dextrane 40 und 70
sowie Hydroxyäthylstärke die einen Anteil von mindestens
90 % Amylopectin-Hydrolysat, eine Eigenviskosität von 0,05-
0,3 dl/g bei 25° C, einen Äthersubstitutionsgrad bis 0,9
15 Hydroxyäthylgruppen/Glucoseeinheit, ein gewichtsgemitteltes
Molekulargewicht M_w bis 700000, und ein teilchengemitteltes
Molekulargewicht M_n bis 100000 aufweist. Die Dextrane sowie
die Hydroxyäthylstärke sind als solche im Handel und deshalb
leicht erhältlich. * die klinischen

20 15 Als Hämoglobin wird vorteilhaft zellfreies (stromafreies)
Hämoglobin eingesetzt, das aus frischem Humanblut frei von
Antigenen, Zellbestandteilen und Pyrogenen lyophilisiert
hergestellt wurde. Hierzu bedient man sich beispielsweise
eines Druckfiltrationsgerätes mit einem Membranfilter der
25 Porengröße 3µm, um das Humanblut zellfrei zu filtrieren.

25 Als chemische Brücke B kommen gerad- oder verzweigtkettige
aliphatische Gruppen mit 3 - 14 Kohlenstoffatomen, vorzugs-
weise 4 - 10, insbesondere 4 - 8 Kohlenstoffatomen infrage.
30 Spezielle Beispiele für gerad- oder verzweigtkettige Alkyl-
gruppen sind die Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl-, Heptyl-,
Oktyl-, Nonyl-, Decyl-, Undecyl-, Dodecyl- und die Myristyl-
gruppe wie deren isomere Formen. Vorstehend genannten Alkyl-
gruppen können auch eine oder mehrere ungesättigte Bindungen
35 enthalten. Beispiele für Alkenylgruppen sind die Allyl-,
1-Methylallyl-2-Methylallyl-(Methallyl-), 2-Butenyl-(Crotyl-),
3-Butenyl-, 1,2-Dimethylallyl-, 1,1-Dimethylallyl-, 2-Äthyl-
allyl-, 1-Methyl-2butenyl-, 2-Methyl-2butenyl-, 3-Methyl-2-
butenyl-, 3-Petenyl-, 2,3-Dimethyl-2-butenyl-, 1,1,2-Trimethylallyl-,
1,3-Dimethyl-2-buteneyl-, 1-Äthyl-2-buteneyl-, 4-Methyl-2-pentenyl-,
2-Äthyl-2-pentenyl-, 4,4-Dimethyl-2-pentenyl-, 2-Heptenyl-, 2-
Oktenyl-, 5-Oktenyl-, 2-Nonenyl-, 2-Decenyl-, 2-Dodencenyl- und dgl.

1 Vorstehenden Alkylgruppen können auch in der Seitenkette Alkoxygruppen aufweisen, wobei beispielsweise die 2-Methoxypropyl-, 3-Methoxypropyl-, 3-Propoxypropyl-, 2-Methoxybutyl-, 3-Äthoxybutyl-, 4-Butoxybutyl-, 2-Äthoxyhexyl-, 3-Methoxy-3-methylpentyl-, 4-Methoxyoktylgruppe in Frage kommen können.

Die vorstehenden Alkylgruppen, die ggf. ein oder mehrere ungesättigte Bindungen oder Alkoxygruppen aufweisen, können mit zunehmender Kettenlänge wasserunlöslich werden, was so-10 wohl bei der Synthese als auch beim Endprodukt von Nachteil sein kann. Diese Eigenschaft lässt sich dadurch verbessern oder aufheben, daß ein oder mehrere Hydroxygruppen eingeführt werden. Spezielle Beispiele für derartige Gruppen sind Abkömmlinge von Di-, Tri- und Tetraglycerin.

15 Die vorstehenden C_3 - C_{14} haltigen Gruppen können auch als Cycloalkylgruppen vorliegen, wobei die Cyclohexyl-, 4-tert-Butylcyclohexyl-, 3-Isopropylcyclohexyl-, 2,2-Dimethylcyclohexyl-, Cycloheptyl- und die Cylooctylgruppe in Frage kommen können.

20 Die reaktiven Gruppen R_1 und R_2 sind bei den zyklischen Gruppierungen vorzugsweise in 1,4 Stellung ankondensiert.

Zu C_3 - C_{14} haltigen Gruppen gehören weiterhin Arylgruppen, wie die Phenyl-, Biphenyl-, 1-Naphtyl- und die 2-Naphtyl-25 gruppe, die ggf. mit den vorstehend genannten Alkyl-, Alkenyl-, Alkoxyalkyl-, oder Cycloalkylgruppen substituiert sein können.

Beispiele für Alkarylgruppen sind die o-Tolyl-, m- Tolyl-, p-Tolyl- und die p-tert-Butylphenylgruppe, die isomere; 30 Form der Xylol-Gruppen, die isomeren Formen der Trimethylphenylgruppen und die 4-Äthyl-1-naphtylgruppe.

Beispiele für Aralkylgruppen sind die Benzyl-, Phenyläthyl-1-Phenyläthyl-, 2-Phenylpropyl-, 4-Phenylbutyl-, 6-Phenylhexyl-, 35 5-Phenyl-2-methylphenyl- und 1-Naphtyl-methylgruppe.

Beispiele für Alkarylgruppen sind die o-Tolylmethyl-, m-Tolylmethyl-, p-Tolylmethylgruppe und dgl.

9 01.00.00

3029307

-8-

1 Beispiele für Alkoxyaralkylgruppen sind die o-Methoxyphenyl-, m-Methoxyphenyl-, p-Methoxyphenyl-, 2-(m-Methoxyphenyl)-ethyl-, 4-Methoxy-1-naphthylmethylgruppe und dgl.

5 Als reaktive Gruppen R_1 und R_2 , die jeweils die Verbindung zwischen der Brücke B und der Matrix M bzw. dem Hämoglobin Hb darstellen und die gleiche oder verschiedene Bedeutung besitzen können, kommen üblicherweise folgende Gruppierungen in Frage:

10 $-O-, -NH-, -N-, -S-, -S(CH_2)-, -N(CH_2)_m-NH-, -NH-(CH_2)_m-NH-,$
 $=N-(CH_2)_m-N=, -NH-(CH_2)_m-N=$, wobei m entweder 0 (also mit dem Ausgangsprodukt Hydrazin) oder eine ganze Zahl von 1-14 bedeutet, $-O-C-$ oder $-NH-C-$.

15 Bevorzugte reaktive Gruppen R_1 und R_2 sind die Gruppierungen der Formel
 $-O-, -NH-, -N-, -NH-NH-, =N-NH-, =N-N=, -O-C- \text{ und } -NH-C-.$

20 Precursoren für die vorstehend genannten Gruppierungen R_1 und R_2 sind Halogenatome, Amino-, Amid-, Carboxyl-, Carbonyl-, Säurehalogenid-, Säureacid-, Sulfhydryl-, Imidazo- und Thiomethylgruppen.

25 Bevorzugte Ausgangsverbindungen sind α, ω -Diamine der allgemeinen Formel II



30 und ω -Aminocarbonsäuren der allgemeinen Formel III

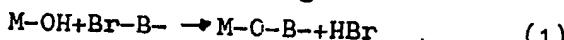


Besonders bevorzugte Verbindungen der allgemeinen Formel
 35 III und III sind diejenigen, bei denen B aliphatische Gruppen mit 3-14 Kohlenstoffatomen darstellt.

1 Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Blutersatzmittels wird üblicherweise zuerst die Brücke B an die Matrix M über die reaktive Gruppe R_1 angekuppelt und anschließend wird das erhaltene Produkt über die zweite reaktive Gruppe R_2 mit dem zellfreien Hämoglobin verbunden. Die Reihenfolge der Kupplung ist jedoch nicht erfindungswesentlich und kann deshalb umgekehrt werden.

Um eine Brücke B mit der Matrix M zu koppeln, muß einer der 10 beiden Reaktionsteilnehmer mindestens eine reaktionsfreudige Gruppe aufweisen. Da als Matrix M gewöhnlich Polysaccharide, also Verbindungen mit OH-Funktionen eingesetzt werden, müssen entweder diese Hydroxy-Gruppen der Polysaccharide in eine reaktive Form überführt werden oder aber die Brücke B 15 muß besonders reaktionsfreudige Gruppen aufweisen, beispielsweise Halogenatome oder Doppelbindungen, die mit der Hydroxygruppe reagieren können.

Unter den Halogenatomen ist das Bromatom bevorzugt, das nach 20 folgender Gleichung 1

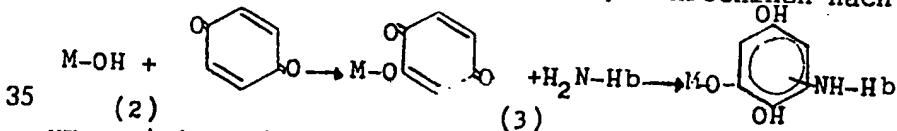


in der M-OH die Matrix mit einer beliebig ausgewählten OH-Gruppe bedeutet und die Brücke B die vorstehende Bedeutung besitzt, mit der Matrix unter Abspaltung des entsprechenden 25 Bromwasserstoffs reagieren kann.

Das nach der Gleichung 1 erhaltene Produkt kann wiederum über eine entsprechende reaktive Gruppe R_2 mit dem Hämoglobin umgesetzt werden.

30

Andererseits kann die Matrix M auch mit einer reaktiven Doppelbindung, beispielsweise mit p-Benzochinon nach Gleichung 2



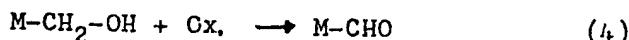
umgesetzt werden. Das erhaltene Produkt kann mit einer Aminogruppe des Hämoglobins nach Gleichung 3 reagieren.

Diese Reaktion ist stark vom pH-Wert abhängig. Bei einem

1 pH-Wert von 9 treten beispielsweise starke Vernetzungen und Farbbildung auf, während die Reaktion bei einem pH-Wert von 7 offensichtlich zu einem geringeren Vernetzungsgrad führt. Durch Steuerung des pH-Wertes lassen sich also beliebige

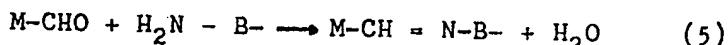
5 Vernetzungsgrade erzeugen, so daß unterschiedlich hohe Molekulargewichte die aus mehreren Matrix- und Hämoglobineinheiten herrühren, erhalten werden können.

Wenn die Brücke B endständige funktionelle Gruppen aufweist, 10 die nicht mit einer Hydroxygruppe der Matrix reagieren können, muß diese Hydroxygruppe der Matrix aktiviert werden, wobei häufig eine milde Oxidation mit Natriumperjodat nach folgender Gleichung 4 bevorzugt ist



15 Es können jedoch auch andere reaktive Stoffe, beispielsweise Acylhalogenide, Alkylhalogenide, Isocyanate oder Bromcyan eingesetzt werden.

20 Das nach Gleichung 4 erhaltene Produkt kann beispielsweise mit der Aminogruppe als endständige Gruppe der Brücke B nach Gleichung 5



25 unter Bildung einer Schiff'schen Base umgesetzt werden. Da derartige Schiff-Basen häufig nicht besonders stabil sind und zur Bildung von Folgeprodukten neigen, werden sie vorzugsweise mit Natrium- oder Lithiumborhydrid, je nach dem eingesetzten Lösungsmittel, hydriert.

30 Wenn die endständige reaktive Gruppe der Brücke B eine Aldehyd-Gruppe ist, so erfolgt die Kupplung mit der gemäß Gleichung 5 aktivierten Matrix mit Hilfe einer Verbindung mit zwei endständigen Aminogruppen der allgemeinen Formel



35 in der m die Bedeutung von 0 (Hydrazin) besitzt oder eine ganze Zahl von 1-14 darstellt.

1 Die Verbindung mit der allgemeinen Formel IV reagiert nach folgender Gleichung 6

M-CHO + $H_2N-(CH_2)_m-NH_2 + OCH-B- \longrightarrow M-CH=N(CH_2)_m-N=CH-B-$ (6)
 mit den beiden Aldehydgruppen der Matrix und der Brücke
 5 unter Bildung einer doppelten Schiff'schen Base. Bevorzugt ist bei dieser Umsetzung die Verwendung von Hydrazin. Weiterhin ist bevorzugt, daß die nach Gleichung 6 erzeugten Schiff'schen Basen hydriert werden.

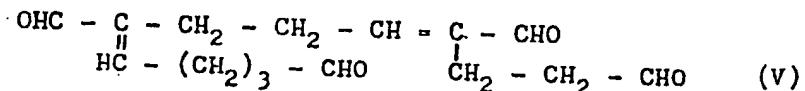
10 Setzt man gemäß Gleichung 6 eine Brücke mit zwei endständigen Aldehydgruppen, also einen Dialdehyd ein, wie Malondialdehyd, Succindialdehyd, Glutardialdehyd und dgl., dann ist der Reaktionsmechanismus dieser Dialdehyde häufig nicht gesichert, da sowohl die Aldehydgruppen unter Bildung von
 15 Schiff'schen Basen als auch die durch Keto-Enol-Tautomerie gebildeten Doppelbindungen gemäß der Michael-Addition (Reaktion mit aktiven Methylengruppen oder Stickstoffatome enthaltenden Funktionen) mit der endständigen Aminogruppe reagieren können. Der Glutardialdehyd der Formel IV

20



liegt häufig trimerisiert in seiner crotonisierten Form der allgemeinen Formel V vor

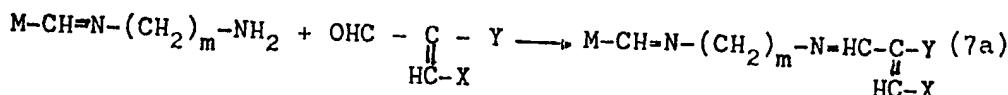
25



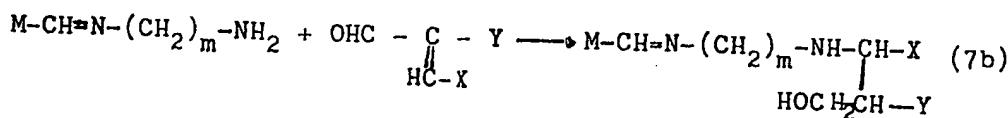
Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist die Reaktion des trimerisierten Glutardialdehyds mit dem Reaktionsprodukt aus Hydrazin und der aktivierten Matrix gemäß Gleichung 4 einerseits und dem zellfreien Hämoglobin andererseits. Nach der Wahl des pH-Werts können entweder die freien Carbonylfunktionen des trimerisierten Glutardialdehyds oder aber die Doppelbindungen mit aktiven Wasserstoffatomen, beispielsweise der Amino- oder Thiogruppe reagieren. Da die Brücke B lediglich als spacer, also zur Erzeugung eines bestimmten Abstandes zwischen Matrix und Hämoglobin dienen soll, können beide Reaktionsarten gleichermaßen zur Brücken-

1 bildung eingesetzt werden.

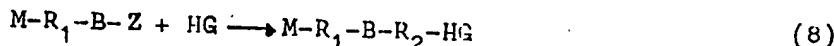
5 Diese Reaktionen sind in der nachfolgenden Gleichung 7 a und 7 b gezeigt, in der der trimerisierte Glutardialdehyd verkürzt dargestellt ist, wobei die Gruppen X und Y die nicht in die Reaktion eingreifende Reste des Glutardialdehyd der allgemeinen Formel V darstellen.



10



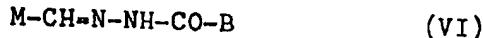
15 15 Die nach Gleichung 1, 5, 6 und 7 erhaltenen Produkte aus der Umsetzung der Matrix M mit einer Brücke B werden nach der Gleichung 8



20

20 25 25 in der Z eine funktionelle Gruppe darstellt, mit Hämoglobin zum erfindungsgemäßen Endprodukt der allgemeinen Formel I umgesetzt. Als Gruppe Z kommen die Carboxyl-, Amid-, Carbonyl-, Amino-, Thio-, oder Thiomethylgruppe in Frage. Die Gruppen mit der Bedeutung Z können mit einer oder mit mehreren reaktiven Gruppen des Hämoglobinmoleküls, wie Amino-, Thio-, Carboxyl- oder Thiomethylgruppen reagieren. Weiterhin kann die Gruppe Z auch eine Doppelbindung, beispielsweise die Doppelbindung des trimerisierten Glutardialdehyds bedeuten, 30 30 die mit aktivierten Wasserstoffen, beispielsweise der Amino- gruppe oder der Thiogruppe reagieren kann.

35 Die nach Gleichung 4 erhaltene aktivierte Matrix kann auch mit einem Hydrazid oder Dihydrazid einer α, ω -Dicarbonsäure oder einer ω -Aminocarbonsäure umgesetzt werden, wobei eine mit einer Brücke versehene Matrix der allgemeinen Formel VI



1 erhalten wird. In der Formel VI ist wie in den vorstehenden Formeln und Gleichungen die Bedeutung der endständigen Gruppe offen gehalten und kann beispielsweise eine Gruppe der Bedeutung Z, eine Säurehydrazidgruppe und dgl. sein.

5 2 Die Kupplung dieser Gruppen mit aktiven Gruppen des Hämoglobinmoleküls erfolgt entweder aufgrund ihrer eigenen Reaktivität oder aber über aktivierte Zwischenzustände, beispielsweise über N-Hydroxysuccinimide und dgl., wie sie beispielsweise aus der Peptid-Synthese bekannt sind.

10 3 Doppelbindungen lassen sich, wie bereits vorstehend festgestellt, durch Hydrierung mit Alkalosalzen von Borhydriden hydrieren. Ubrig gebliebene Carbonylfunktionen werden blockiert, beispielsweise durch TES, das nachstehend beschrieben ist. Die Zwischen- und Endprodukte werden üblicherweise gegen destilliertes Wasser dialysiert und dadurch gereinigt.

15 4 Die Umsetzung eines Brückenmoleküls mit der Matrix beträgt üblicherweise 5:1, vorzugsweise 1:1. Das dadurch erzeugte Zwischenprodukt aus Brückenglied und Matrix kann bis zu 5 Hämoglobinmoleküle entnehmen und nimmt vorzugsweise ein Hämoglobinmolekül auf. Ein besonders bevorzugtes Endprodukt der allgemeinen Formel I besteht aus jeweils einem Molekül Matrix, Brücke und Hämoglobin.

20 5 Nachstehend werden die allgemeinen Reaktionsbedingungen beschrieben, die zu den vorstehend beschriebenen Zwischen- und Endprodukten führen.

25 6 Die Aktivierung von Polysacchariden durch Oxydation mit Perjodat gemäß Gleichung 4 wird nach der Methode von Fleming et al, Acta biol med germ. Bd. 30 (1973) S. 177 durchgeführt, wobei man in Wasser oder alkoholischen Wassergemischen arbeitet. Die Reaktionstemperatur liegt normalerweise zwischen 0 und 50, vorzugsweise zwischen 5° C und der Raumtemperatur. Die Reaktionszeit hängt vom Substitutionsgrad der Reaktionsteilnehmer, also beispielsweise der Hydroxyethylstärke HES ab und steigt mit steigen-

1 dem Substitutionsgrad an. Die Abtrennung und Reinigung des erhaltenen Produkts erfolgt durch Dialyse gegen aqua dest.

Das mit Perjodat oxidierte Produkt wird bei einem pH-Wert 5 von 3-7, vorzugsweise 4,5-5,5 mit einem α , ω -Diamin oder einer ω -Aminocarbonsäure gemäß Gleichung 5 umgesetzt, wobei der pH-Wert unter Kontrolle gehalten wird. Es wird mit hohem Überschuß an Diamin oder Aminocarbonsäure gearbeitet, um möglichst sämtliche Carbonylgruppen umzusetzen. Die Umsetzung erfolgt üblicherweise bei Raumtemperatur innerhalb 10 einer Zeit von 4-10 Stunden.

Um restliche Carbonylfunktionen zu blockieren, wird bei spielsweise TES (N-Tris(Hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure) zugesetzt. Anschließend erfolgt die Reinigung 15 des Produkts wiederum durch Dialyse gegen aqua dest.

Sofern ein Diamin mit der aktivierten Polysaccharidverbindung umgesetzt worden ist, kann die endständige Aminofunktion mit 20 Glutardialdehyd nach Gleichung 7 verlängert werden, wobei vorzugsweise bei einem pH-Wert von 7-8, insbesondere bei 7,5 (Phosphatpuffer mit einer Phosphatkonzentration von etwa 0,5 Mol.) gearbeitet wird. Die in wässriger Lösung ablaufende Umsetzung erfolgt üblicherweise bei Temperaturen oberhalb der 25 Raumtemperatur, vorzugsweise zwischen 30 und 50°, insbesondere bei 37° C über einen Zeitraum von mehreren Tagen, vorzugsweise 15-25 Stunden. Die Reinigung des Endproduktes erfolgt wiederum durch Dialyse gegen aqua dest.

30 Falls das oxidierte Polysaccharidprodukt mit einer endständigen Aminofunktion gekuppelt wird, entsteht eine Schiff'sche Base gemäß Gleichung 5, deren Doppelbindung ggf. durch Reduktion mit Natriumborhydrid in wässriger Lösung bei alkalischen Bedingungen (pH ca. 9) beseitigt werden kann. Nach der 35 Zugabe von NaBH_4 arbeitet man unterhalb der Raumtemperatur zwischen 8 und 24 Stunden, vorzugsweise 12 Stunden weiter. Da bei Einsatz von NaBH_4 neben der Reduzierung der Doppelbindungen auch die übrig gebliebenen Carbonylgruppen zu

1 Hydroxygruppen reduziert wurden, erübrigt sich die Zugabe von TES. Die übrigen Reaktionsteilnehmer werden vom Reaktionsprodukt wiederum durch Dialyse gegen aqua dest. entfernt.

5 Die Umsetzung mit Benzochinon gemäß Gleichung 2 erfolgt üblicherweise unter Verwendung von Polysaccharid und p-Benzochinon, wobei das Benzochinon in einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Ethanol, gelöst wird. Um eine zu starke Kopplung zu vermeiden, wird bei einem pH-Wert von 6-8, vorzugsweise 7 gearbeitet, wobei zweckmäßigerweise wiederum Phosphatpuffer verwendet wird.

10

Die vorstehend erhaltenen Zwischenprodukte, die ein Makromolekül als Matrix und eine chemische Brücke aufweisen, werden mit dem freien Ende der chemischen Brücke an zellfreies Hämoglobin angekoppelt, wobei üblicherweise bei pH-Werten von 8-11, vorzugsweise 9,5 (Bicarbonatpuffer) und Temperaturen von etwa 0-30, vorzugsweise 5-10° C gearbeitet wird.

15

20 Hochmolekulare Vernetzungsprodukte werden anschließend durch Filtration, beispielsweise durch Druckfiltration gereinigt. Das klare Filtrat lässt sich weiter in einer Ultrafiltrationsanlage, beispielsweise von der Firma AMICON, über eine Membran, beispielsweise die mit PM 10 bezeichnete Membran fraktionieren, sofern der pH-Wert auf 7,4 eingestellt wird. Das erhaltenen Produkt wird durch Gefriertrocknen in eine stabile Form überführt und kann über lange Zeit aufbewahrt werden.

25

30 Wenn andererseits als Brückenglied eine ω -Aminocarbonsäure gemäß Gleichung 5 eingesetzt wird, kann das erhaltene Produkt durch Umsetzung seiner endständigen Carboxylgruppe mit aktivierenden Substanzen, beispielsweise N-Hydroxysuccinimide oder EDAC (1-Aethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid), ungesetzt werden, wobei bei dem ersten Diimid

35 wasserfrei und bei EDAC in Wasser gearbeitet wird. Diese Umsetzung mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) führt durch Reaktion mit N-Hydroxysuccinimid zu einem aktiven Ester, der mit einer Aminofunktion oder Thiofunktion des Hämoglobins zum gewünschten

1 Endprodukt reagieren kann. Diese Reaktion von DCC wird üblicherweise in wasserfreien organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Dioxan durchgeführt, wobei die Umsetzungszeit zwischen einer und vier Stunden variieren kann.

5 Sofern jedoch ein wasserlösliches Carbodiimid, beispielsweise EDAC, zum Einsatz kommt, kann das aus der Kopplung mit Polysaccharid und ω -Aminocarbonsäure erhaltene Produkt direkt in Wasser mit Hb, umgesetzt werden, wobei wiederum die Carboxylgruppe mit einer NH_2 - oder SH-Gruppe des HG koppelt.

10

Der pH-Wert ist zwischen 3 und 7, vorzugsweise bei pH 5 zu halten. Die Umsetzungszeit liegt üblicherweise bei 3-15, vorzugsweise bei 6-8 Stunden.

15 Der Reinheitsgrad der erhaltenen Komplexe kann durch schnelle GPC überprüft und deren Molekulargewicht abgeschätzt werden. Weiter lassen sich folgende Parameter kontrollieren: Viskosität, Hämoglobin-Anteil, Polysaccharid-Anteil, Methämoglobin-Gehalt, Osmolarität und pH-Wert.

20 Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

a) Oxidation

25 8,5 g Dextran bzw. Hydroxyäthylstärke (HES) (0,05 Mol) werden in 100 ml Wasser gelöst. Unter Rühren wird dann eine Lösung aus 1,2 g Natriumperjodat in 10 ml Wasser zugegeben. Die Mischung bleibt über Nacht bei $+5^\circ\text{C}$ stehen. Das Oxidationsprodukt wird dann gegen aqua dest. 30 dialysiert.

Die Reaktionsdauer wird mit wachsendem Substitutionsgrad bei HES entsprechend verlängert.

35 b) Umsetzung mit α, ω -Diamin

Das dialysierte Oxidationsprodukt wird bei einem pH-Wert von etwa 5 mit 20 ml einer 2- molaren Lösung von

1 Äthylendiamin tropfenweise versetzt. Dabei muß der pH-Wert kontrolliert und evtl. nachjustiert werden. Anschließend wird bei Raumtemperatur 6-10 Stunden vorsichtig gerührt. Die Lösung wird danach mit dem gleichen Volumen 0,1 M TES 5 versetzt, um überschüssige Aldehydfunktionen zu blockieren. Zum Schluß wird wiederum gegen aqua dest. dialysiert.

c) Umsetzung mit Glutardialdehyd
wird

Die Reaktionslösung/durch Zugabe von festem KH_2PO_4 und 10 Na_2HPO_4 auf pH 7,5 eingestellt, wobei eine Phosphatkonzentration von 0,5 Mol erreicht werden soll. Diese gepufferte Lösung wird in 50 ml einer 25%-igen wässrigen Glutardialdehyd-lösung eingerührt, wobei der pH-Wert kontrolliert und ggf. nachjustiert wird. Die Umsetzung erfolgt bei 37°C in Wasser, 15 wobei 18 Stunden vorsichtig gerührt wird. Zur Entfernung überschüssigen Glutardialdehyds wird gegen aqua dest. dialysiert.

d) Kupplung mit Human-Hämoglobin

20 8 g Humanhämoglobin werden in 200 ml 0,2 M Bicarbonatpuffer pH 9,5 gelöst, dann in einem Druckfiltrationsgerät (Sartorius) über 3 μm Membranfilter filtriert und in die aus Stufe c erhaltenen Lösung eingerührt, wobei diese Reaktion bei $+5^\circ\text{C}$ durchgeführt wird.

25

Nach Ablauf der Kupplungsreaktion, die durch analytische Gelchromatographie verfolgt wird, wird wieder mit einem Filter der Porengröße 3 μm filtriert, um hochmolekulare Vernechtungsprodukte abzutrennen. Das klare Filtrat wird zur weiteren Reinigung in einer Ultrafiltrationsanlage (AMICON) über eine Membran PM 10 fraktioniert und auf pH 7,4 umgepuffert. Die wässrige Lösung des Hämoglobin-Polysaccharid-Komplexes wird anschließend gefriergetrocknet.

35

Der Reinheitsgrad der Komplexe kann durch schnelle GPC überprüft und deren Molekulargewicht abgeschätzt werden (Pitz, LeKIM, Chromatographia, Bd. 12, (1979) S. 155). Weitere

1 Parameter bei der Qualitätskontrolle sind Viskosität, Hämoglobin-Anteil, Polysaccharid-Anteil, Hämoglobingehalt, Osmolarität und pH-Wert.

5 Beispiel 2

Die Stufen a und b gemäß Beispiel 1 werden wiederholt, wobei jedoch anstelle von Äthylendiamin Hydrazin eingesetzt wird. Das erhaltene Produkt, nämlich eine Schiff'sche Base wird mit Natriumborhydrid reduziert.

10

Nach Abschluß der Reaktion mit Hydrazin bei pH 5 wird der pH-Wert durch Zugabe von festem Na_2CO_3 auf 9,0 eingestellt. Danach werden 10 ml einer frisch bereiteten 5 M wässrigen NaBH_4 -Lösung unter Rühren in kleinen Anteilen zugegeben. Es wird 12 Stunden bei $+5^\circ\text{C}$ weitergerührt, wobei zu starkes Schaumen vermieden werden soll. Die Zugabe von TES erübrigt sich, da auch überschüssige Aldehydgruppen durch Natriumborhydrid reduziert werden. Zur Entfernung von nicht umgesetztem Hydrazin sowie NaBH_4 wird die Lösung gegen aqua dest. 20 dialysiert.

Die weitere Umsetzung mit Glutanaldehyd und Kupplung mit Hämoglobin erfolgt entsprechend Beispiel 1.

25 Beispiel 3

Die Stufe a gemäß Beispiel 1, also Oxidation mit Natriumperjodat wird wiederholt. Anschließend erfolgt die Umsetzung mit α -Aminocarbonsäure.

30

Zu einer Lösung aus 8 g oxidiertem Dextran (bzw. HES) werden bei einem pH-Wert von 5 insgesamt 20 ml einer 2M Lösung von 6-Aminocapronsäure in Äthanol/Wasser zugetropft. Dabei muß der pH-Wert kontrolliert und ggf. korrigiert werden. Anschließend wird bei Raumtemperatur 6-10 Stunden vorsichtig gerührt. Zur Blockierung überschüssiger Aldehyd-Funktionen wird die Lösung mit dem gleichen Volumen 0,1 M TES versetzt und noch weitere 3 Stunden gerührt. Anschließend wird gegen

1 aqua dest. dialysiert. Die weitere Umsetzung mit Glutardialdehyd und Kupplung mit Hämoglobin erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

5 Beispiel 4

Das Polysaccharid wird wie in Beispiel 3 oxydiert und dann mit einer ω -Aminocarbonsäure umgesetzt. Das erhaltene Produkt wird mit Carbodiimid aktiviert und anschließend mit Hämoglobin gekuppelt.

10 Das Reaktionsprodukt aus Polysaccharid und der ω -Aminocarbonsäure wird unter Rühren mit 8 g Humanhämoglobinlösung in 100 ml Wasser versetzt. Der pH-Wert wird dann mit verdünnter Salzsäure auf 4,7 - 5,0 eingestellt. Unter Rühren wird 20 mg EDAC hinzugefügt. Der pH-Wert wird anschließend sofort wieder auf 5,0 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von etwa 6 Stunden wird das Carbodiimid durch Dialyse vollständig entfernt.

Beispiel 5

20 8,5 g Dextran 70 bzw. HES 200/0,5 werden in 100 ml Phosphatpuffer pH 7 aufgelöst und anschließend wird eine Lösung aus 5,4 g p-Benzochinon in 20 ml Äthanol eingerührt. Zum Schluß der Reaktion wird nicht umgesetztes Benzochinon durch Dialyse entfernt. Zur Kupplung werden 8,0 g Human-Hämoglobin in 200 ml Phosphat-Puffer pH 7 gelöst und mit der vorgelegten Dextran- (bzw. HES)-Benzochinon-Verbindung umgesetzt. Die Umsetzung erfolgt bei + 5° C. Der erhaltene Hämoglobin-Polysaccharid-Komplex wird - wie in Beispiel 1 beschrieben - gereinigt und analytisch untersucht.

25 30 In den Fig. 1 und 2 sind Elutionsdiagramme und in den Fig. 3 und 4 Absorptionspektren der Umsetzungsprodukte ^{gem.} ~~gem.~~ dargestellt. Beispiel 3 einerseits und von Hämoglobin Hb andererseits, Die Elutionsdiagramme von Humanhämoglobin Hb, Dextran-70-Hämoglobin D 70-Hb sowie Dextran-250-Hämoglobin D 250-Hb wurden auf Spheron P1000 durch schnelle GPC erhalten. Als chemische Brücke wurde 6-Aminocapronsäure eingesetzt. Sowohl aus den Elutionsdiagrammen als auch den Absorptions-

21

3029307

-18-

spektren kann entnommen werden, daß die durch die einzelnen Reaktionsteilnehmer erzeugten Endprodukte eine Veränderung im Elutionsverhalten als auch spektroskopische Veränderungen erzeugen, so daß sicher gestellt wird, daß tatsächlich makro-
5 molekulare Kupplungsprodukte entstanden sind.

10

15

20

25

30

35

BAD ORIGINAL

Nummer: 3029307
Int. Cl. 3: A61K 31/715
Anmeldetag: 1. August 1980
Offenlegungstag: 4. März 1982

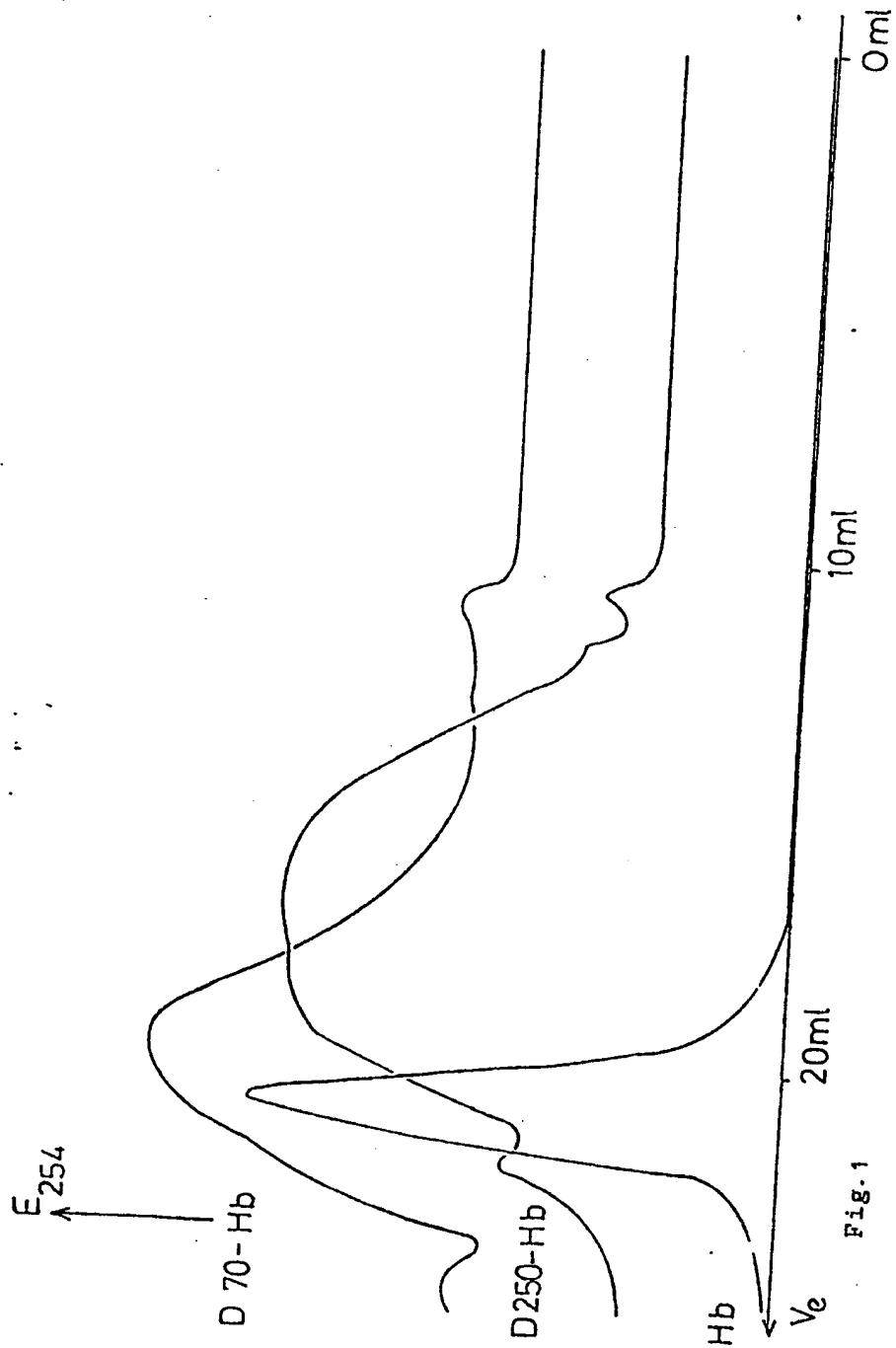


Fig. 1

- 26 -

01

3029307

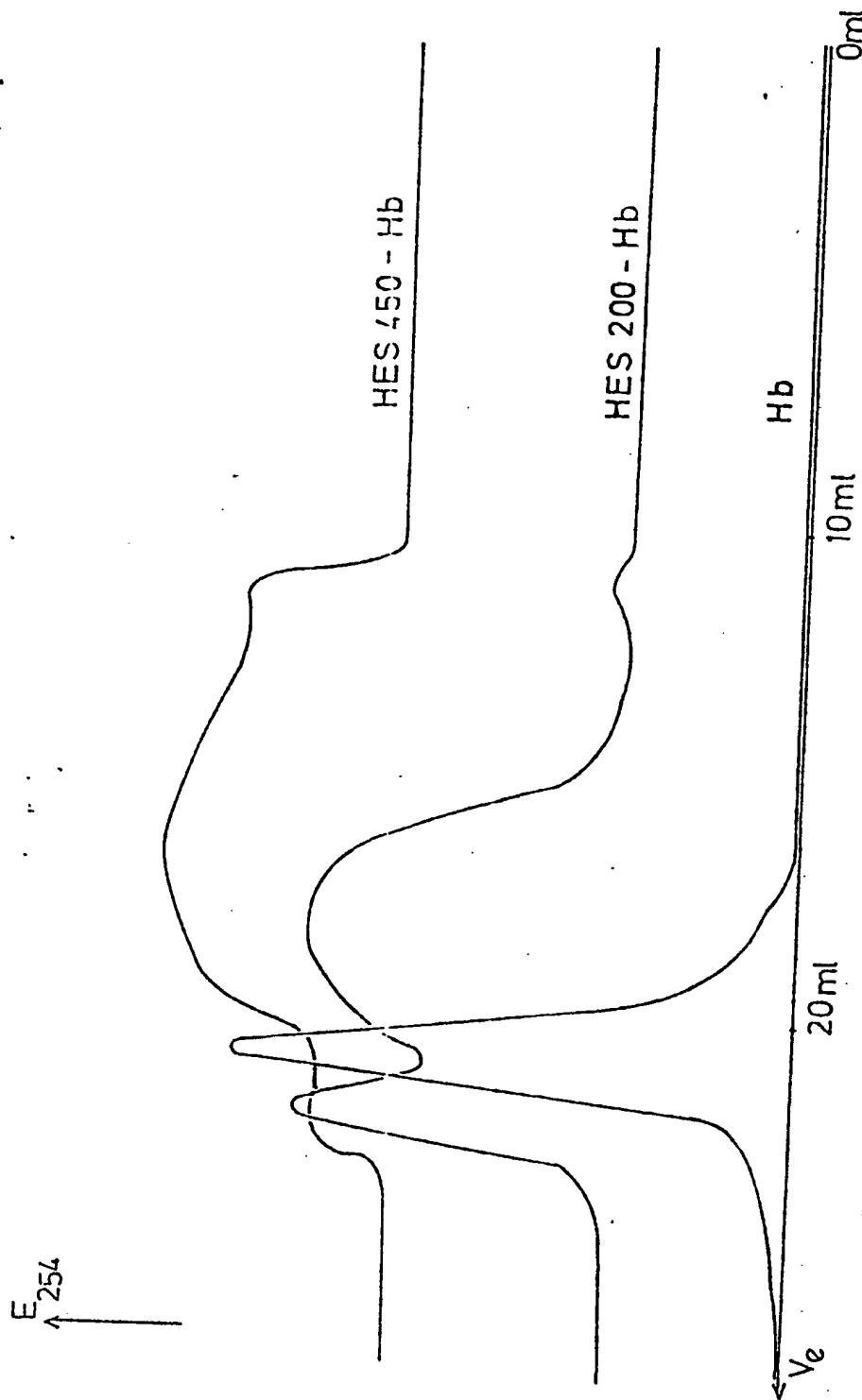


Fig. 2

KUHNEN & WACKER
- Patentanwaltsbüro -
R.A. Kuhnent, Dipl.-Ing.
W. Luderschmidt, Dr., Dipl.-Chem.
P.A. Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.
Schneggstr. 3-5, 8050 FREISING

ORIGINAL INSPECTED

3029307

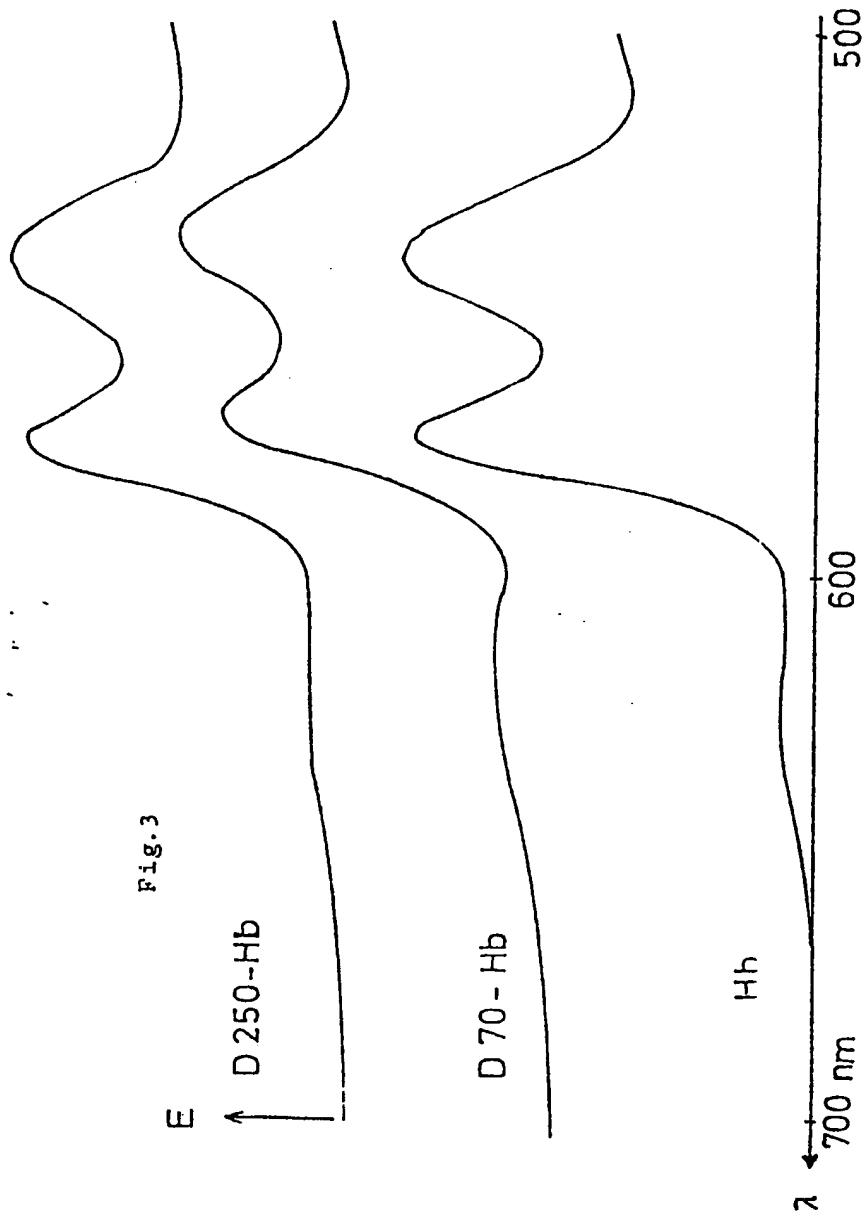


Fig. 3

UHNEN & WACKER

Steueranwaltsbüro -

.. Kuhnen, Dipl.-Ing.

Luderschmidt, Dr., Dipl.-Chem.

.. Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.

3029307

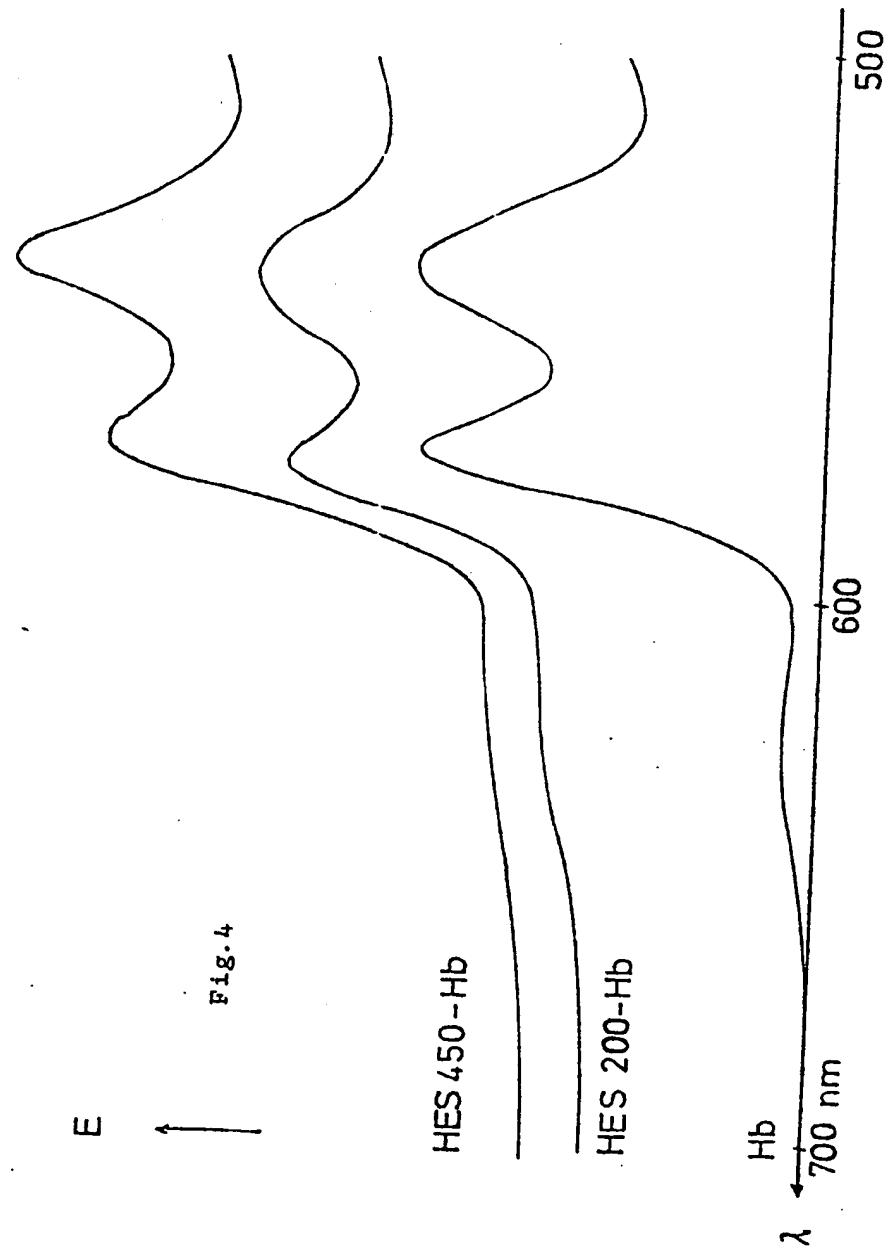


Fig. 4

KUHNEN & WACKER
- Patentanwaltsbüro -
R.A. Kuhnen, Dipl.-Ing.
W. Luderschmidt, Dr., Dipl.-Chem.
P.A. Wacker, Dipl.-Ing., Dipl.-Wirtsch.-Ing.
Schneggstr. 3-5, 8050 FREISING